



TITLE:

# Advancing Synthetic Gene Regulators Development with High-Throughput Sequencing Technologies( Abstract\_要旨 )

AUTHOR(S):

Anandhakumar, Chandran

---

CITATION:

Anandhakumar, Chandran. Advancing Synthetic Gene Regulators Development with High-Throughput Sequencing Technologies. 京都大学, 2015, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2015-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19260>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により要約は2016-07-31に公開

( 続紙 1 )

京都大学	博 士 ( 理 学 )	氏 名	Anandhakumar Chandran
論文題目	Advancing Synthetic Gene Regulators Development with High-Throughput Sequencing Technologies (ハイスループットシーケンシング技術を用いた革新的遺伝子制御法の開発に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>Next-generation-sequencing (NGS)/High-throughput sequencing technologies enable us to obtain extensive information by deciphering millions of individual DNA sequencing reactions simultaneously. Sequencing on this scale facilitates significant advances in diverse disciplines, ranging from discovery, design, and evaluation of many small molecules and relevant biological mechanisms for personalized therapies. We used this sequencing technology to gain in-depth insight into DNA binding small molecules-triggered biological phenomena and its redesign. We have also used NGS application to identify specific targets of small molecule. In this thesis, we systematically studied the binding mechanism and its corresponding biological effects of various types of synthetic gene regulators in global genome scale, using the interface of chemical biology and high-throughput sequencing.</p>			
<p>1. <u>Next-Generation Sequencing Studies Guide the Design of Pyrrole-Imidazole Polyamides with Improved Binding Specificity by the Addition of <math>\beta</math>-alanine</u></p>			
<p>In this chapter, we studied the high-affinity binding sites of the previously reported small molecules: SAHA-PIP I and its structurally similar counterpart SAHA-PIP K, both activate entirely different set genes. By using the Next Generation Sequencing based Bind-n-seq approach, we identified the binding specificity of SAHA-PIP I and SAHA-PIP K in a broad context of synthetic oligo libraries. Both compounds showed highly significant binding efficiency compared with PIP I and PIP K (PIPs without SAHA). This prompted us to redesign SAHA-PIPs and replace the SAHA moiety with <math>\beta</math>-alanine (the <math>\beta</math>-moiety) in the non-core binding region of the 10-ring hairpin polyamide. The results showed that the <math>\beta</math>-moiety enforces binding of PIP in the closed form. This discovery is being useful for the current PIP conjugates developments.</p>			
<p>2. <u>Deciphering The Genomic Targets Of Alkylating Polyamide Conjugates Using High-Throughput Sequencing</u></p>			
<p>In this study, we have made use of high-throughput sequencing technology to show</p>			

the significant sequence specific binding and alkylation of alkylating PIP-indole-*seco*-CBI conjugates corresponding to the proposed DNA binding rule. Results of this study indicate the structural composition of PIP-indole-*seco*-CBI conjugates favorably alters the sequence specificity of PIPs. In the future, this method may be an efficient tool compared with conventional PAGE analysis for studying sequence-specific alkylation and designing of small molecules for targeted gene silencing. Apart from the chemical arrangement of PIP, the organization of histone-DNA packed nucleosome may affect the binding sites availability. It is unclear, whether nucleosome dependent binding sites may lead to the reduction in binding specificity of PIP conjugates. We have also developed a method to map the alkylating PIP conjugates binding regions throughout the human genome. Our genome level mapping study recognized a new significant genomic target for alkylating PIP in the field of breast cancer.

### 3. Genome-wide mapping of artificial transcriptional activators

Here, we studied the effective SAHA PIPs specific binding mechanism in nucleus from living cells. Though, the SAHA PIPs have millenary predicted binding sites, only a few of those trigger a specific gene regulation. We previously showed individual SAHA PIPs can regulate a unique set of genes in human somatic cells (like iPSc and germ cell activating gene network). In a complex genomic space, the reason for strong and specific biological effects of SAHA-PIPs is not clear. Our SAHA PIP specific pull-down based high-throughput sequencing study resulted, SAHA-PIPs specific binding sites among the sequenced reads. Mapping of SAHA-PIPs bound enriched areas on the whole human genome directly indicates its specific biological gene regulations are due to its chromatinized DNA specific binding. Here, we used non-crosslinking small molecules, so it may be suitable to recognize other DNA binding small molecule's genomic effects based on its binding in the actual chromatinized genome.

In summary: combining various cross-points of chemical biological approaches and high-throughput sequencing applications, we have effectively proved the sequence specific properties of artificial gene regulators in actual genome space. Aftermath of these studies will focus on prospective applications of high-throughput sequencing technologies in small molecule based chemical biological therapeutics development.

## (論文審査の結果の要旨)

*N*-メチルピロール-*N*-メチルイミダゾール (PI) ポリアミドは、ネトロプシンやディスタマイシンAといった抗生物質に由来した人工分子であり、DNAの副溝に入り込み配列特異的に結合する興味深い性質をもっている。すなわち、*N*-メチルピロールは、A、C、Tと、*N*-メチルイミダゾールは、Gとの間に水素結合を形成することによって、DNAの塩基配列を認識している。PIポリアミドは人工分子であるにもかかわらず、その結合能力や塩基配列の認識能は、転写因子に匹敵している。そのため、このPIポリアミドにヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤やDNAアルキル化剤と結合させることで、様々なDNA塩基配列特異的な遺伝子発現制御剤の合成と評価が行なわれている。しかしながら、認識配列への結合能や反応性の評価は、SPRを用いた解析や配列決定用のゲル電気泳動を用いる例がほとんどであり、結合が予測されるマッチ配列と任意のミスマッチ配列への結合定数や反応性の差を評価するに留まっていた。

申請者は、次世代シーケンサーを用いたBind-n-seq法により、PIポリアミドにHDAC阻害能を付与したSAHAコンジュゲートの配列特異的な結合能について詳細に解析を行った。その結果、中心部をランダム化した次世代シーケンサー用フラグメントDNAに対して、遺伝子発現における作用の異なる2種のビオチン化PIポリアミド (SAHA-PIP IとK) でプルダウンすると、それぞれのPIポリアミドが配列認識則により予想される塩基配列に対して結合することを実証した。これらの結果から、小分子の結合配列について次世代シーケンサーを用いてバイアス無く評価できることを示した。PIポリアミドがヘアピン型でDNAに結合する際に、分子内のβ-アラニン部位が必要であることも明らかにした。さらに、ヒト培養細胞の核に対して2種のビオチン化PIポリアミドで同様にプルダウンを行ったところ、それぞれがヒトゲノム中でも予想される配列に結合することを確認し、これらのプロモーター領域への結合の違いが、遺伝子発現上昇の違いに影響を与えていることも示した。

このような遺伝子発現の変化と配列特異的な結合分子との詳細な解析はこれまでに例がなく、世界に先駆けて実施された解析といえる。さらに、PIポリアミドアルキル化剤コンジュゲートの反応する配列についても、次世代シーケンサーを用いた配列解析法を新たに開発した。この方法論をヒト培養細胞の核に対して行った結果、ゲノム中での反応部位から抑制される遺伝子の予測も行った。

以上、本論文は、小分子のDNAへの配列特異的な結合と反応を、次世代シーケンサーを用いて分子レベルで解析した独創的なものである。これらの申請者の成果は、配列特異的なPIポリアミドの遺伝子発現調節活性を調べる上で今後不可欠な手法となり、次世代シーケンサーが様々な分野で応用可能であることを示している。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認められる。また、平成27年7月30日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った。その結果、合格と認められた。

要旨公表可能日：                      年                      月                      日以降